

PAT-NO: JP409121889A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 09121889 A

TITLE: NONDESTRUCTIVE VIABILITY EVALUATION OF TIGHTLY SEALED
AND FREEZE-DRIED MICROORGANISM

PUBN-DATE: May 13, 1997

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

HAMAGUCHI, HIROO

SUZUKI, EIICHIRO

ISHIHARA, MASARU

YAMANAKA, SHIGERU

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

KANAGAWA KAGAKU GIJUTSU AKAD

N/A

AJINOMOTO CO INC

N/A

APPL-NO: JP07283589

APPL-DATE: October 31, 1995

INT-CL (IPC): C12Q001/02, G01N021/65

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable easy nondestructive evaluation of the viability of a microorganism which is freeze-dried and sealed in a vessel by subjecting the vessel to Raman spectroscopy with out unsealing and determining its viability based on the ratio of carbon dioxide/oxygen in the vessel.

SOLUTION: A sealed vessel containing freeze-dried microorganism is placed in another vessel for Raman spectroscopy which is made of a material capable of interrupting the interfering light due to the random reflection of the sealed vessel and has an incident inlet, a transmitted light outlet and a Raman scattering light output port and/or a filter which interrupts only this interfering light or passing only the light near a detection wave length and is

subjected to the Raman spectroscopy. Based on the ratio of carbon dioxide to oxygen in the gas in the sealed vessel, the viability of the microorganism is nondestructively determined in a shortened time.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-121889

(43)公開日 平成9年(1997)5月13日

(51)IntCl ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/02		7823-4B	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 21/65			G 0 1 N 21/65	

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 5 頁)

(21)出願番号	特願平7-283589	(71)出願人	591243103 財団法人神奈川科学技術アカデミー 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号
(22)出願日	平成7年(1995)10月31日	(71)出願人	000000068 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
		(72)発明者	浜口 宏夫 東京都稲城市向陽台5-10-7-407
		(72)発明者	鈴木 榮一郎 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内
		(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 密封保存凍結乾燥微生物の非破壊生存判定法

(57)【要約】

【課題】 密封保存凍結乾燥微生物が生存しているか死滅しているかをその密封保存容器を開封破壊することなく短時間で容易に判定する方法の提供。

【解決手段】 上記微生物をその密封保存容器を開封することなくそのままラマンスペクトル分析に付し、該容器内における炭酸ガス対酸素の比に基づいて該微生物の生存性を非破壊的に判定する方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 密封保存凍結乾燥微生物をその容器を開封することなくそのままラマンスペクトル分析に付し、容器内気体における炭酸ガス対酸素の比に基いて該微生物の生存性を判定することを特徴とする密封保存凍結乾燥微生物の非破壊生存判定法。

【請求項2】 密封保存容器による乱反射に由来する妨害光を遮断すべく、光源波長を透過しない材質からなる、入射光入り口、透過光出口及びラマン散乱光取り出し口を有する容器に該密封保存容器を収納して、並びに／或いは、該妨害光のみを遮断する又は検出光波長近辺のみを透過するフィルターを光路に使用してラマンスペクトル分析を行うことを特徴とする請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微生物の生存に関する非破壊検査法、更に詳しくは、凍結乾燥して長期間密封保存した微生物（ライオフィール微生物）を当該密封保存容器を破壊することなく、そのまま、即ち容器ごとラマンスペクトル分析に付し、該容器内気体の炭酸ガス対酸素の比に基いて該微生物が生存しているか死滅しているかを判定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】無菌状態にある医薬品アンフル中の窒素及び酸素ガスを回転ラマンスペクトル分析法により測定し、アンフル中のガス充填が所定通りになされているかを否かを検査する方法が知られている（GLEN F. BAILEY and HERBERT A. MOORE, JR.: Journal of the Parenteral Drug Association, 34, (2)127-133(1980)）。しかし、密封保存した凍結乾燥微生物を開封することなく、振動ラマンスペクトル分析に付し、該微生物の生存性を容器内気体における炭酸ガス対酸素の比に基いて判断する方法は知られていない。

【0003】従来、微生物は、例えば当該微生物を凍結乾燥し、アンフルに封入して保存している。そして、保存中の生存を確認するためには、作製したアンフルの内の何本かを実際に破壊していわゆる生存試験を行ない、その結果から他の保存アンフルの生存又は死滅を推定しているものであって、目的のアンフルの生存又は死滅そのものを直接に判定しているわけではない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】前項記載の従来技術の背景下に、本発明は、密封保存した凍結乾燥微生物を、その容器を破壊することなしに容易に生存しているかを否かを判定することのできる方法を開発することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、前項記載の目的を達成すべく鋭意研究の結果、凍結乾燥微生物を取

2

容した密封保存容器内の気体の組成、より具体的には該気体における炭酸ガス対酸素の比と該微生物の生存性との間に相関関係があること、及び該密封保存容器内の気体の組成は、ラマンスペクトル分析を利用すれば、容器を破壊せずとも極めて容易に測定しうることを見出し、このような知見に基いて本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は密封保存凍結乾燥微生物をその容器を開封破壊することなくそのままラマンスペクトル分析に付し、容器内気体における炭酸ガス対酸素の比に基いて該微生物の生存性を判定することを特徴とする密封保存凍結乾燥微生物の非破壊生存判定法、及びこのような方法の実施に適するラマンスペクトル分析法に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】本発明にいう密封保存凍結乾燥微生物の微生物としては、酵母、細菌、放線菌、糸状菌などの微生物を挙げることができる。

【0009】密封保存凍結乾燥微生物とは、上記微生物をライオフィールチューブにスキムミルク、グルタミン酸ナトリウム等の保護剤と共に封入し、凍結乾燥して減圧下又は常圧下で封管したチューブを言う。

【0010】本発明によれば、このよう密封保存容器は、微生物の凍結乾燥物（ライオフィール微生物）を収容したままラマンスペクトル分析に付されるので、その器壁は少なくとも一部が光線が容器内気体を貫通できるものではなくてはならない。

【0011】また、例えば、ライオフィールチューブ入りの凍結乾燥微生物をそのまま直接測定した場合、ガラスチューブやアンフルによる乱反射の影響が大き過ぎるときは、乱反射に由来する妨害光を遮断するために、光源波長を透過しない金属製の特別な形状の容器を使用するか又はフィルターを使用するか或いは両者を併用することで、このような影響を除くことができる。そのような特別な形状の容器として、例えば、図1に示す筒状容器を挙げることができる。この容器の径は、密封保存容器（封管）の径に応じてある範囲で可変のものとすることもできる。

【0012】凍結乾燥微生物を密封保存容器に収容したままラマンスペクトル分析に付する方法は、例えば、次のようにして行なうことができる。

【0013】特別な形状の容器を使用する場合は、図1に示すように、これに凍結乾燥微生物入りの密封保存容器を収納してラマンスペクトル分析に付する。フィルターを使用する場合は、図2に示すように、光路の適当な位置にフィルターをおいてラマンスペクトル分析に付する。図2においてフィルターとしては、励起レーザー光波長のみを除去できるフィルターを使用することができる。なお、Sはサンプル（試料）を、そしてIPDAはダイオードアレイ（intensified photo

diode array)を意味する。他に、CCD (chargecoupled device)やIC CD(intensified CCD)なども用いることができる。

【0014】スペクトルとしては、振動スペクトル及び回転スペクトルがあるが、本発明方法の実施においては、そのいずれに拠ることもできる。ただし、前者の方が、レーリ散乱光から波長的に遠いために乱反射により妨害され難く、かつ低分解能の条件でも成分のスペクトルが十分に分離して検査できる点で後者よりも優れている。

【0015】ラマンスペクトル分析用光源としては、試料に損傷を与えず、密封保存容器の器壁を透過するものであれば、その波長を問わず、例えば、Ar⁺レーザーのレーザー光で514.5nm、488.0nmなどの波長のものを使用することができる。振動スペクトルの場合、N₂、O₂及びCO₂は、それぞれ、ラマンシフトが2331、1555及び1388cm⁻¹(他にフェルミ共鳴により1286cm⁻¹にも出現)である。

【0016】このような機器を使用してデータを採取し、そして採取したデータの処理は、例えば、次のようにして行なうことができる。サンプルの凍結乾燥微生物入り密封保存容器と同様の空の容器に空気を封入したものをラマンスペクトル分析に付してブランクとして測定し、機器の補正を行なう。次に、サンプルの密封保存容器中の窒素、酸素及び二酸化炭素をラマンスペクトル分析に付して測定し、窒素に対する酸素の比(O₂/N₂)及び窒素に対する二酸化炭素の比(CO₂/N₂)を算出し、前者の比で後者の比を除して酸素に対する二酸化炭素の比(CO₂/O₂)を算出する。ここで、それぞれの比の値は、本来、スペクトルのピークの面積の比を求めるべきであるが、半値幅はほぼ等しい場合においてはそのピークの高さの比を用いてもかまわない(後掲実施例1はこれによっている)。酸素に対する二酸化炭素の比は、比較の便宜上から空気中の酸素に対する二酸化炭素の比を1として、これとの比較の値(相対値)で表わすこともできる。また、もちろん、ラマンスペクトル上での、ブランク値との絶対強度の比較から二酸化炭素及び酸素の存在量そのものを定量又は半定量

し、これらの値を使用することもできる。

【0017】本発明者の知見によれば、このようにラマンスペクトル分析によって得られた密封容器の気体における炭酸ガス対酸素の体積比(CO₂/O₂)が大きいものは当該微生物が死滅しており、小さいものは生存している。後掲実施例参照。因みに、これは、炭酸ガス対酸素の比が大きいものは、保存中も微生物菌体が呼吸して酸素が消費され、炭酸ガス及び水が生成し、これらが菌体の生存にとって、膜構造の変化、代謝阻害、水へのCO₂の溶解によるpH低下などの悪影響を及ぼしたものと推定され、一方、小さいものは、保存中の菌体による呼吸がほとんどなく、そのような悪影響がなかったものであることによるものと推定される。

【0018】そこで、ある密封保存凍結乾燥微生物について、ラマンスペクトル分析に付して得られた炭酸ガス対酸素の比と、これを従来法により生存試験を行なって得られた生存状況との関係は、同様の条件で保存されてきた他の密封保存凍結乾燥微生物にも当てはまるので、後者の微生物については、従来法による生存試験を行なわなくても、前者の微生物についての生存状況から推定してその生存状況が容易に判定できるのである。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に説明する。

【0020】実施例1

ライオファイルチューブ(保護剤:スキムミルク10%、グルタミン酸ナトリウム2%)で31年間10℃で保存した酵母12株を、それぞれ、ライオファイルチューブ入りのまま乱反射防止用アダプター(図1の特殊形状の容器)に収納しAr⁺レーザー光を光源とするラマンスペクトル分析に付し、直接チューブ中のガス組成を測定した。窒素、酸素及び二酸化炭素を測定し、空気中の窒素を基準としてO₂/N₂及びCO₂/N₂の値からCO₂/O₂の値を算出した。

【0021】その後、ガス組成を測定したライオファイルチューブを無菌的に開管し、いわゆる生存試験に付してチューブ中の生菌数の計数を行なった。

【0022】結果を下記第1表に示す。

【0023】

【表1】

第1表

菌 株	CO ₂ / O ₂	生菌数 ^(*)
<i>Pichia membranifaciens</i> (A)	0.65 (410) ^(**)	検出せず
<i>Pichia anomala</i> (A)	2.00 (1300)	検出せず
<i>Pichia anomala</i> (B)	1.51 (940)	検出せず
<i>Willopsis californica</i>	0.54 (340)	検出せず
<i>Pichia condensis</i>	1.15 (720)	検出せず
<i>Torulospira delbrueckii</i> (A)	0.32 (200)	2.0×10 ³
<i>Torulospira delbrueckii</i> (B)	0.37 (230)	1.1×10 ⁴
<i>Cryptococcus albidus</i> (A)	0.21 (140)	8.0×10 ⁵
<i>Cryptococcus albidus</i> (B)	0.23 (150)	2.8×10 ⁶
<i>Cryptococcus albidus</i> (C)	0.27 (170)	1.5×10 ⁴
<i>Cryptococcus albidus</i> (D)	0.27 (170)	5.0×10 ⁷
<i>Candida magnoliae</i>	0.21 (130)	5.8×10 ⁷

※1: CO₂ / O₂ の欄でカッコ内の値は、空気中の CO₂ / O₂ を1としたときの相対値を表す。

※2: 生菌数は、チューブ当りのCFU (Colony Forming Unit) 数で表わした。

【0024】第1表から理解されるように、空気中の CO₂ / O₂ = 0.0016 との相対値が 340 以上のチューブでは、いずれも生菌が検出されず、死滅していたが、一方、230 以下のものは生存が確認されたので、同様の条件における保存株については、300 を境界として、それ以下を生存、そしてそれ以上を死滅とする判定を非破壊

【0025】

【発明の効果】密封保存冷凍乾燥微生物が生存しているか死滅しているかを密封保存容器を開封破壊することなく短時間で直接判定することができる。このことから、*

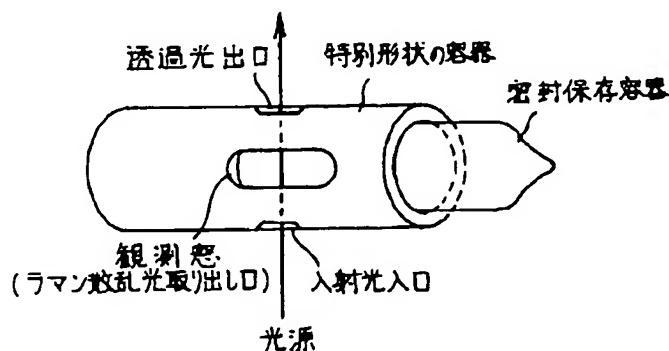
* 密封保存凍結乾燥微生物の作成本数を大幅に削減することができ、また、無駄な植え継ぎによる微生物の変異の危険を防止できる。さらに、CO₂ / O₂ の比を経時的に測定することにより、当該保存微生物の死滅時期を予想することが容易となる。

【図面の簡単な説明】

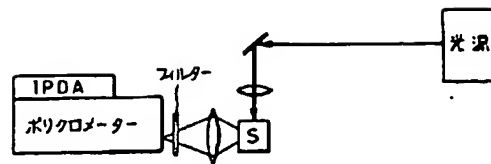
【図1】ラマンスペクトル分析を行なうときの、密封保存容器を収納すべき容器を例示する。

【図2】ラマンスペクトル分析を行なうときの、光路におくべきフィルターの位置を例示する。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 石原 勝
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社中央研究所内

(72)発明者 山中 茂
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社中央研究所内

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] In more detail, it freeze-dries, and this invention gives the nondestructive inspection about survival of a microorganism, and the microorganism (RAIO file microorganism) which carried out prolonged seal preservation to Raman spectrum analysis whole remaining as it is, i.e., a container, without destroying the seal preservation container concerned, and relates to the method of or judging [in which this microorganism survives based on the ratio of the carbon-dioxide-gas pair oxygen of this container bashful object] whether extinction being carried out.

[0002]

[Description of the Prior Art] The nitrogen and oxygen gas in the drug ampul in an aseptic condition are measured by the rotational-Raman-spectrum analysis method, and the method of inspecting whether gas charging in ampul is made as predetermined is learned (GLEN F.BAILEY and HERBERT A.MOORE.JR.:Journal of the Parenteral Drug Association, 34, (2)127-133 (1980)). However, without opening the freeze-drying microorganism which carried out seal preservation, oscillating Raman spectrum analysis is given and the method of judging the survivability of this microorganism based on the ratio of the carbon-dioxide-gas pair oxygen in a container bashful object is not learned.

[0003] Conventionally, a microorganism freeze-dries the microorganism concerned, for example, and encloses and saves it in ampul. And in order to check the survival under preservation, several [in the produced ampul] are actually destroyed, the so-called survival examination is not performed, other survival or extinction of preservation ampul are not presumed from the result, and survival or the extinction itself of the target ampul is not necessarily judged directly.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] this invention aims at developing the method that it can judge whether the freeze-drying microorganism which carried out seal preservation is survived easily, without destroying the container under the background of the conventional technology given in the preceding clause.

[0005]

[Means for Solving the Problem] A correlation is between the ratio of composition of the gas in the seal preservation container which held the freeze-drying microorganism, and carbon-dioxide-gas [in / this gas / more specifically] pair oxygen, and the survivability of this microorganism wholeheartedly as a result of research that this invention person should attain the purpose given in the preceding clause, And when using Raman spectrum analysis, composition of the gas in this seal preservation container found out that a container was not destroyed but ** could also be measured very easily, and completed this invention based on such knowledge.

[0006] That is, this invention gives a seal preservation freeze-drying microorganism to Raman spectrum analysis as it is, without carrying out opening destruction of the container, and it is related with the non-destroying survival diagnosis of the seal preservation freeze-drying microorganism characterized by judging the survivability of this microorganism based on the ratio of the carbon-dioxide-gas pair oxygen in a container bashful object, and the Raman spectrometry suitable for operation of such a method.

[0007]

[Embodiments of the Invention] Hereafter, this invention is explained in detail.

[0008] Microorganisms, such as yeast, bacteria, an Actinomyces, and mold, can be mentioned as a microorganism of the seal preservation freeze-drying microorganism said to this invention.

[0009] A seal preservation freeze-drying microorganism means the tube which enclosed the above-mentioned microorganism with the RAIO file tube with protective agents, such as skim milk and a sodium glutamate, was freeze-dried and carried out the sealed tube under reduced pressure or the ordinary pressure.

[0010] Since a such seal preservation container is given to Raman spectrum analysis according to this invention, with the freeze-drying object (RAIO file microorganism) of a microorganism held, the container wall must not be that to which a beam of light can penetrate [at least a part] a container bashful object.

[0011] Moreover, in order to, intercept the disturbance light originating in a scattered reflection for example, when the freeze-drying microorganism containing a RAIO file tube is measured directly as it was, and the influence of a scattered reflection with a glass tube or ampul is too large, such influence can be removed by using both together, using a filter, using the container of special configurations, such as metal which does not penetrate light source wavelength. As a container of such a special

configuration, the tubed container shown in drawing 1 can be mentioned. Also let the path of this container be a thing adjustable in the range to which it has responded to the path of a seal preservation container (sealed tube).

[0012] ***** given to Raman spectrum analysis, holding a freeze-drying microorganism in a seal preservation container can be performed as follows, for example.

[0013] It is ** which contains the seal preservation container containing a freeze-drying microorganism to this, and is given to Raman spectrum analysis as shown in drawing 1 when using the container of a special configuration. It is ** which sets a filter in the suitable position of an optical path, and is given to Raman spectrum analysis as shown in drawing 2 when using a filter. The filter from which only excitation laser beam wavelength is removable as a filter in drawing 2 can be used. In addition, in S, a sample (sample) and IPDA mean a diode array (intensified photodiode array). CCD (chargecoupled device), ICCD (intensified CCD), etc. can be used for others.

[0014] As a spectrum, although there are a vibration spectrum and a rotation spectrum, in operation of this invention method, it can also depend on the any. However, since former one is far from Rayleigh-scattering light in wavelength, it cannot be easily blocked by the scattered reflection, and the spectrum of a component is excellent in the point which fully separates and can be inspected also on condition that [latter] low resolution.

[0015] If an injury is not done to a sample but the container wall of a seal preservation container is penetrated as the light source for Raman spectrum analysis, the wavelength will not be asked, for example, it is Ar+. With the laser beam of laser The thing of wavelength, such as 514.5nm and 488.0 nm, can be used. the case of oscillating SUPEKUKUTORU -- N2 and O2 And CO2 Raman shifts are 2331, 1555, and 1388cm-1 (others -- Fermi resonance -- 1286cm-1 -- an appearance), respectively.

[0016] Processing of data in which extracted data and it extracted can be performed as follows using such a device, for example. What enclosed air with the seal preservation container containing a freeze-drying microorganism of a sample and the container of same sky is given to Raman spectrum analysis, and is measured as blank, and a device is amended. Next, the nitrogen, the oxygen, and the carbon dioxide in the seal preservation container of a sample are given to Raman spectrum analysis, and are measured, the ratio (CO2 / N2) of a carbon dioxide to the ratio (O2 / N2) and nitrogen of oxygen to nitrogen is computed, and the ratio (CO2 / O2) of a carbon dioxide to oxygen is computed by *(ing) the latter ratio by the former ratio. Here, although the value of each ratio should originally ask for the ratio of the area of the peak of a spectrum, it may be in a half-value-width simultaneously etc. by carrying out, and may use the ratio of the height of the peak for a case (back ***** 1 is based on this). The ratio of a carbon dioxide to oxygen can set the ratio of a carbon dioxide to the oxygen in air to 1 from on [of comparison] expedient, and can also express it with the value (relative value) of comparison with this. moreover -- of course -- the abundance of comparison of absolute intensity with the blank value on a Raman spectrum to a carbon dioxide and oxygen itself -- a fixed quantity -- or a half-fixed quantity can be carried out and these values can also be used

[0017] According to this invention person's knowledge, as for what has the large volume ratio (CO2 / O2) of the carbon-dioxide-gas pair oxygen in the gas of the hermetically sealed enclosure obtained by Raman spectrum analysis in this way, the microorganism concerned has become extinct, and the small thing survives. Refer to back *****. Incidentally what has the ratio of carbon-dioxide-gas pair oxygen large [this] Also during preservation, a microorganism biomass breathes, oxygen is consumed and carbon dioxide gas and water generate. These are CO2 to change of a membrane structure, metabolic inhibition, and water for survival of a biomass. What did bad influences, such as a pH decrease by the dissolution, is presumed. on the other hand, a small thing What is depended on that there is almost no respiration by the biomass under preservation, and there is such no bad influence is presumed.

[0018] Then, the ratio of the carbon-dioxide-gas pair oxygen obtained by giving Raman spectrum analysis about a certain seal preservation freeze-drying microorganism, The relation with the survival situation acquired by performing a survival examination by the conventional method this Since it is applied to other seal preservation freeze-drying microorganisms saved on the same conditions, even if it does not perform the survival examination by the conventional method, it presumes from the survival situation about the former microorganism, and the survival situation can judge the latter microorganism easily.

[0019]

[Example] Hereafter, an example explains this invention further.

[0020] 12 stocks of yeast saved at 10 degrees C for 31 years with the example 1 RAIO file tube (protective agent : skim milk 10%, 2% of sodium glutamates) is contained to the adapter for irregular reflection prevention (container of the special configuration of drawing 1) still in the state containing a RAIO file tube, respectively, and it is Ar+. The Raman spectrum analysis which uses a laser beam as the light source was given, and the gas composition in a direct tube was measured. Nitrogen, oxygen, and a carbon dioxide are measured and it is O2 / N2 on the basis of the nitrogen in air. And CO2 / N2 A value to CO2 / O2 The value was computed.

[0021] Then, the open pipe of the RAIO file tube which measured gas composition was carried out in sterile, the so-called survival examination was given, and counting of the number of micro organisms in a tube was performed.

[0022] A result is shown in the 1st table of the following.

[0023]

[Table 1]

第1表

菌 株	CO ₂ / O ₂	生菌数 ^(*)
<i>Pichia membranifaciens</i> (A)	0.65 (410) ^(**)	検出せず
<i>Pichia anomala</i> (A)	2.00 (1300)	検出せず
<i>Pichia anomala</i> (B)	1.51 (940)	検出せず
<i>Willopsia californica</i>	0.54 (340)	検出せず
<i>Pichia condensis</i>	1.15 (720)	検出せず
<i>Torulaspora delbrueckii</i> (A)	0.32 (200)	3.0×10 ⁷
<i>Torulaspora delbrueckii</i> (B)	0.37 (230)	1.1×10 ⁶
<i>Cryptococcus albidus</i> (A)	0.21 (140)	1.0×10 ⁵
<i>Cryptococcus albidus</i> (B)	0.23 (150)	2.8×10 ⁶
<i>Cryptococcus albidus</i> (C)	0.27 (170)	1.5×10 ⁴
<i>Cryptococcus albidus</i> (D)	0.27 (170)	5.0×10 ⁷
<i>Candida magnoliae</i>	0.21 (130)	5.8×10 ⁷

※1: CO₂ / O₂ の欄でカッコ内の値は、空気中の CO₂ / O₂ を1としたときの相対値を表わす。

※2: 生菌数は、チューブ当りのCFU(Colony Forming Unit)数で表わした。

[0024] The relative value of CO₂/O₂ = 0.0016 in air so that I may be understood from the 1st table Although the viable cell was detected by neither but it had become extinct by 340 or more tubes 230 or less thing can perform the judgment which considers less than [it] as survival and considers more than it as extinction bordering on 300 in un-destroying about the stock strain in the same conditions on the other hand since survival was checked.

[0025]

[Effect of the Invention] A seal preservation container can be directly judged [in which the seal preservation freeze drying microorganism survives / or or] for whether extinction is carried out in a short time, without carrying out opening destruction. From this, the creation number of a seal preservation freeze-drying microorganism can be cut down sharply, and the useless risk of the variation of the microorganism plant and according to a splice can be prevented. Furthermore, CO₂ / O₂ By measuring a ratio with time, it becomes easy to expect the extinction stage of the preservation microorganism concerned.

[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.